动 物 学 研 究 1995, 16 (2): 126—131　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

云南普通马矮型马蛋白多态性及其品种分化关系*

宿 兵　刘爱华　林世英　王 文　兰 宏　施立明
(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室　650223)

解德文
(云南省畜牧兽医研究所)

摘要　本文运用蛋白电泳技术对来自云南省文山州马关县和麻栗坡县的 21 匹普通马和 14 匹矮型马进行了分析。共分析遗传座位 44 个，其中有 10 个座位检测到多态性。计算表明，云南普通马的多态座位百分比 P＝0.227，平均杂合度 H＝0.089，平均等位基因数 A＝1.273；相应的云南矮型马的 P＝0.205，H＝0.083，A＝1.250。上述结果表明，云南普通马和矮型马的遗传多样性较为丰富，来自狭小区域内的群体蕴藏着多样的遗传基因。另一方面，通过计算群间遗传距离，我们还发现普通马和矮型马两者在遗传上具有一定的差异。根据分子钟假说和相应的公式，推算两者的分歧时间约为 18.5 万年。

关键词　云南普通马，云南矮型马，蛋白电泳，平均杂合度，遗传距离

云南是我国马品种最为丰富的地区之一，拥有众多优良地方类群。同时，作为矮型马的中心产区，资源调查表明，其数量居全国之首，总数占 80%左右(黄启昆等，1988)。近年来，有关云南矮型马的研究报道多集中于形态、生理、生化及细胞遗传学等方面(黄怀照等，1987)。本文采用蛋白电泳技术，试图对云南普通马和矮型马群体的遗传多样性及其群体间遗传分化关系作出评价，以期为云南马品种遗传资源的保护及合理开发利用提供遗传学资料和依据。

1　材料和方法

本实验中共采集了 35 匹马的血液样品，取样地点为云南省文山州的马关县和麻栗坡县。其中普通家马 21 匹(其中雌性 2 匹)，矮型马 14 匹(均为雄性)。普通马为体高 1.18 m 以上的健康成年马，矮型马为体高在 1 m 以内的健康成年马。

每匹马静脉取血 10 ml，血液用肝素抗凝。在 4℃条件下，将血样由采集地送回实验室分离。首先，以 1000 r/min 离心 10 min，取上层血浆于试管中，−40℃保存。然后，下层红细胞部分以 5—10 倍体积生理盐水洗涤；1000 r/min 离心 10 min，吸掉上清液。

* 云南省应用基础研究重大项目基金资助
本文 1994 年 6 月 28 日收到，同年 8 月 22 日修回

表1 云南普通马、矮型马蛋白多态分析遗传座位(44个)

Tab. 1 Genetic loci(44) assayed in Yunnan common horses and short horses

序号	英文缩写	中文名	标准代码	组织来源	缓冲系统*	序号	英文缩写	中文名	标准代码	组织来源	缓冲系统*
01	ACP	酸性磷酸酶	EC3.1.3.2	红细胞	[1]	02	ADH	乙醇脱氢酶	EC1.1.1.1	红细胞	[2]
03	AK	腺苷激酶	EC2.7.4.3	红细胞	[1]	04	AKP	碱性磷酸酶	EC3.1.3.1	红细胞	[3]
05	ALB	血浆白蛋白	—	血浆	[3]	06	AMY	淀粉酶	EC3.2.1.1	血浆	[6]
07	CAR	碳酸酐酶	EC4.2.1.1	红细胞	[4]	08	CAT	过氧化氢酶	EC1.11.1.6	红细胞	[4]
09	CK	肌酸激酶	EC2.7.3.2	红细胞	[1]	10	CP	铜蓝蛋白	—	血浆	[5]
11	DIA	硫辛酰胺脱氢酶	EC1.6.4.3	红细胞	[4]	12	ESD	脂酶D	EC3.1.1.1	红细胞	[1]
13	EST-1	脂酶-1	EC3.1.1.1	红细胞	[1]	14	EST-2	脂酶-2	EC3.1.1.1	血浆	[4]
15	GDA	鸟嘌呤脱氨酶	EC3.5.4 3	红细胞	[6]	16	GLC	葡萄糖脱氢酶	EC1.1.1.47	红细胞	[2]
17	G6PD	磷酸葡糖脱氢酶	EC1.1.1.49	红细胞	[2]	18	GPD	甘油磷酸脱氢酶	EC1.1.1 8	红细胞	[2]
19	Go-1	乙二醛酶-I	EC4.4.1.5	红细胞	[4]	20	GOT	谷草转氨酶	EC2.6.1.1	红细胞	[1]
21	GR	谷胱苷肽还原酶	EC1 6.4.2	红细胞	[4]	22	GPI	磷酸葡糖异构酶	EC5.3.1.9	红细胞	[1]
23	HB-A	血红蛋白-A	—	红细胞	[5]	24	HB-B	血红蛋白-B	—	红细胞	[5]
25	HK	己糖激酶	EC2.7.1.1	红细胞	[1]	26	HAP	结合珠蛋白	—	血浆	[4]
27	IDH	异柠檬酸脱氢酶	EC1.1.1.42	红细胞	[1]	28	LAP	亮氨酰氨基肽酶	EC3.4.11 1	血浆	[5]
29	LDH-A	乳酸脱氢酶-A	EC1.1.1.27	红细胞	[1]	30	LDH-B	乳酸脱氢酶-B	EC1.1.1.27	红细胞	[1]
31	MDH	苹果酸脱氢酶	EC1.1 1.37	红细胞	[1]	32	ME	苹果酸酶	EC1.1.1.40	红细胞	[1]
33	NP	核苷磷酸化酶	EC2.4.2.1	红细胞	[1]	34	PEP-B	肽酶-B	EC3.4.13.11	红细胞	[1]
35	PEP-D	肽酶-D	EC3.4.13.11	红细胞	[1]	36	6PGD	磷酸葡糖酸脱氢酶	EC1.1.1 43	红细胞	[1]
37	PGM	磷酸葡糖变位酶	EC2.7.1.5	红细胞	[1]	38	$P_{\alpha 2}$	血浆巨球蛋白	—	血浆	[4]
39	PA	前白蛋白	—	血浆	[4]	40	PTF	前转铁蛋白	—	血浆	[4]
41	SDH	山梨醇脱氢酶	EC1.1.1.14	红细胞	[2]	42	TF	转铁蛋白	—	血浆	[4]
43	TO	超氧化物歧化酶	EC1.15.1.1	红细胞	[1]	44	XDH	黄嘌呤脱氢酶	EC1.2.1.37	红细胞	[2]

* 缓冲系统配方见正文部分。

The contents of buffer systems are listed in context

重复洗涤1次。洗涤过的红细胞中加入1／3体积的蒸馏水，使红细胞破裂制成红细胞溶血液，置-40℃保存备用。

本实验采用淀粉胶蛋白电泳技术。淀粉胶浓度为12%。电泳缓冲系统共有6种，适用于不同酶及蛋白质(共计44个遗传座位)的电泳分离(见表1)。包括①Tris-Citrate(pH7.0)；②Tris-Borate-EDTA(pH8.0)；③Borate-NaOH(pH7.8)；④Tris-Borate-EDTA(pH8.6)；⑤LiOH-Borate(pH8.0)；⑥Tris-Citrate-Borate-NaOH(pH7.8)。同功酶及血浆蛋白的组织化学染色方法参照前人的报道(Pasture等，1990；Ferrand，1990；Shaw等，1970)。所用染色试剂为美国SIGMA公司产品。

2 结果和讨论

2.1 云南普通马、矮型马群体的遗传多样性

本研究共检测了云南普通马和矮型马的44个遗传座位，其中10个座位检测到多态性，即有10个杂合座位，每一座位检测到2或3个等位基因(图1)。通常用以衡量群体蛋白多态性的指标包括：多态座位百分比(P值)；平均杂合度(H值)；平均等位基因数(A值)(计算方法见Pasteur等，1990)。相应的，云南普通马的P＝0.227，H＝0.089，A＝1.273；云南矮型马的P＝0.205，H＝0.083，A＝1.250(见表2)。

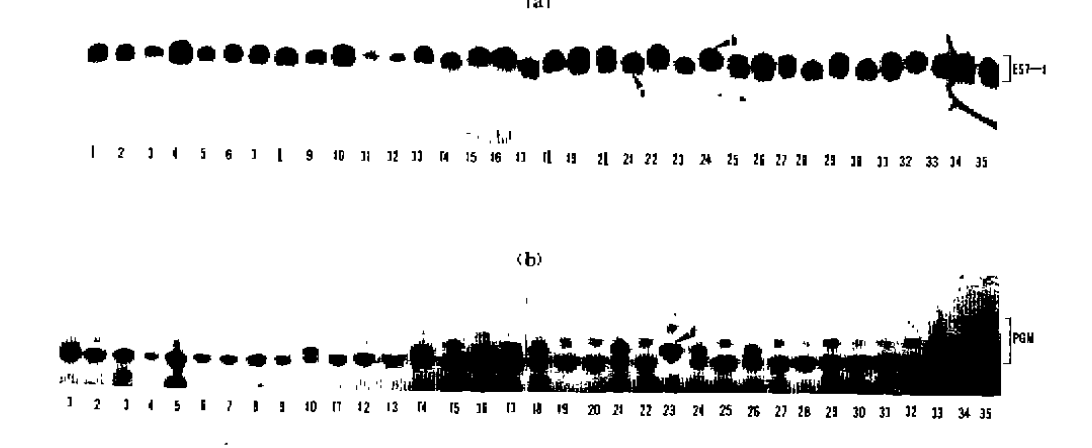


图1 云南普通马、矮型马脂酶-1(EST-1)和磷酸葡糖变位酶(PGM)电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of esterase-1(EST-1) and phosphog lucomutase (PGM) of common horses and short horses

1-14号为矮马，15-35号为普通马。(a)EST-1座位有两个等位基因，以a,b表示；它们在各样品中的分布为(1aa2ab3aa4ab5ab6ab7ab8bb9bb10ab11ab12bb13ab14bb15aa16aa17bb18aa19ab20ab21bb22aa23bb24aa25ab26ab27ab28bb29ab30bb31ab32aa33ab34ab35ab)。(b)PGM座位同样显示两个等位基因，以c,d表示，基因型分布为(1cd2cc3cc4cc5cc6cc7cc8cc9cc10cd11cc12cc13cc14cd15cc16cd17cc18cd19cc20cc21cd22cc23dd24cd25cc26cd27cc28cc29cc30cc31cc32cc33cd34cc35cd)。

No 1-14 are from short horses, No. 15-35 are from common horses. (a) There are two allels on EST-1 locus the genotype of each sample is identified as following, 1aa2ab3aa……35ab (b) There are two allels on PGM locus too, genotypes are 1ab2aa3aa ……35ab, repectively

表 2 云南普通马、矮型马 10 个蛋白多态座位杂合度值(h)

Tab.2 Mean heterozygosity of 10 genetic loci in Yunnan common horses and short horses

	6PGD*	PGM	GPI	EST-1	EST-2	DIA	ALB	PA	TF	PTF
普通马	0.046	0.337	0.217	0.499	0.489	0.496	0.444	0.482	0.418	0.472
矮型马	0	0.191	0.255	0.490	0.436	0.477	0.459	0.497	0.367	0.500

* 遗传座位的英文缩写，全称见表 1。

同功酶技术作为遗传多样性及品种鉴定的研究手段之一，自 70 年代发展以来，已在野生动物和家养动物中得到了广泛的应用。根据 Nevo 等(1984)的统计数据，在已研究过的哺乳动物类群中，H 值平均为 0.050，P 值平均为 0.222(Nevo 等，1984)。相比之下，云南普通马和矮型马的蛋白多态程度是比较高的。这两个群体的遗传背景较为丰富，蕴藏着多样的遗传基因。无疑，这将为马品种的选育提供可选择的遗传素材。当然，Nevo 等的数据多来源于对野生动物群体的研究，而家养动物是在人工选择条件下发展起来的，家养动物的遗传多样性状况又怎样呢？ 70 年代，日本的 Nozawa 等对东亚地区的数种家养动物的蛋白多态性进行了广泛研究。他们的研究结果给出了相当水平的平均杂合度值，其中马的平均杂合度值高达 0.1 以上(Nozawa 等，1976，1980)。然而，他们的材料没有包括中国的马。并且由于当时技术条件的限制，所分析的遗传座位数仅有 21 个，这使得平均杂合度值可能偏高；因为所分析遗传座位的多少在很大程度上影响 H 值同实际情况的近似程度。考虑到以上的因素可以认为，我们关于云南马的蛋白多态结果同 Nozawa 等的结果是相当的。

另外，对来自同样地区的 6 匹云南马(3 匹普通马，3 匹矮型马)的线粒体 DNA 片断长度多态性(mtDNA RFLP)分析也显示了非常丰富的多态性，并且结合化石和史料记载，研究者推测云南马是多起源的(Wang 等，1994)。另外，近来我们实验室对云南其它若干种家养动物，如猪、牛、羊、鸡等的研究却显示了普遍较低的遗传多样性。这种低的遗传多样性不仅表现在蛋白质水平上，而且在线粒体水平也是如此(Lan 等，1993；Wang 等，1994)。蛋白多态性高的结果从另一侧面为云南马的多起源假说提供了证据，尤其是同云南的其它家养动物相比之后。由此看来，无论是蛋白质还是 DNA 水平的研究均显示，普通马和矮型马虽仅来自云南省文山州两个县的狭小区域，但却拥有丰富的遗传多样性。由于对云南其它地区的马尚未做有关遗传多样性方面的研究，因此还不能作出更加全面的评价。但是，无疑云南马是值得我们进一步深入研究并加以重视和保护的马遗传资源。

2.2 云南普通马与矮型马的遗传分化关系

根据 Nei 等(1972)的方法，我们由各个遗传座位的等位基因频率计算出普通马和矮型马的群间遗传距离 D 值为 0.0317(计算公式见 Nei 等，1972)。这个数值表明两者在遗传上还是有一定差异的。当然，这种差异是在统计学意义上的。因为，在我们所分析的 44 个遗传座位中还没有发现特征性的基因型，即没有发现仅有一个群体中存在而另一群体中没有的，从而可以作为遗传标记的基因型。此外，用来自同样地区的普通马和矮型马所作的染色体及线粒体 DNA 的研究表明：①我们未发表的数据表明，家马和矮型马的染色体众数均为 $2n=64$，G 带和银染核仁组织者区(NORs)均无明显差异，但 C 带带型显示异

染色质区的大小两者有所不同)。②线粒体的 RFLP 分析未找到能将两者分开的特异性的多态标记(Wang 等，1994)。相应的，由蛋白多态数据得到的遗传距离数值可以推测，普通家马与矮马分化时间可能比较短。根据 Nei 等(1983)的由遗传距离推算分歧时间的公式，我们计算出两者的分化事件发生在距今约 18.5 万年以前，当时的地质年代是处于更新世晚期。

此外，古气候和古生物学的资料表明，当时地球由于造山运动而经历了气候和地貌的巨大变迁；在造成大量古生物绝灭的同时，也为新物种演生及种内群体间的分化创造了条件。另外，史料中早在汉代(公元前 400 年左右)已有矮马的记载，古称"果下马"(黄启昆等，1988)。当然，由于分歧时间较短，还未形成特征性的遗传差异；并且长期以来两个品种是混在一起饲养，频繁的基因交流也会消弱两者的遗传差异。根据上面的分析，我们建议将云南矮型马与普通家马分群饲养。这不但有助于保证矮型马种的遗传背景不受外来品种的干扰，并且通过人工选择可在短期内选育出优良的矮马品系。

致谢 感谢本实验室朱春玲、聂龙同志在实验分析中所给予的帮助。

参 考 文 献

黄启昆等编著，1988. 云南省家畜家禽品种志. 昆明：云南科技出版社，9—17.

黄怀照等，1987.安宁果下马生理生化指标的系统测定和比较分析. 西南民族学院学报(畜牧兽医版). (2)：85—87.

Ferrand N，1990. Biochemical and genetic studies on rabbit hemoglobin. *Biochem. Genet.* **28**：117–122

Lan H，Shi L M，1993. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in Southwest China：An approach from mitochondrial DNA polymorphism. *Biochem. Genet* **31**：51–60.

Nei M，1972. Genetic distance between population. *Amer. Nat* **106**：283–292.

Nei M *et al*，1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data *J Mol. Evol.* **19**(2)：153–170

Nevo E，Beiles A *et al*，1984. In：Cook L M ed. Genetic and ecological diversity. London：Champan & Hall 105–109.

Nozawa K *et al*，1976. Blood protein variation within and between the east Asian and European horse populations. *Z. Tierzuchty Zuchtysbiol*，**93**：**60–74.**

Nozawa K *et al*，1980. Proceedings of SABRAO workshop on animal genetic research in Asia and Oceania (Personal communication).

Pasture N，Pasture G *et al*，1990. Practical Isozyme Genetics. New York：Haslted Press.

Shaw C R，Prasad R，1970. Starch gel electrophoresis of enzymes–a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* **4**：297–320.

Wang W *et al*，1994. Multiple genotypes of mitochondrial DNA with a horse population from a small region in Yunnan Province of China *Biochem. Genet.* (accepted)

PROTEIN POLYMORPHISM AND GENETIC DIFFERENTITION IN YUNNAN COMMON HORSE AND SHORT HORSE POPULATIONS

Su Bing Liu Aihua Lin Shiying Wang Wen Lan Hong Shi Liming

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Xie Dewen

(Yunnan Institute of Domesticated Animals)

Abstract

In this paper, using protein electrophorsis, we analyzed two different populations of Yunnan horses, the Yunnan common horses(21 individuals) and the short horses(14 individuals). Of all the 44 genetic loci surveyed, 10 of them were found to be polymorphic. Therefore, as for the common horse population, the percentage of polymorphic loci(P) is 0.227, the mean heterozygosity(H) is 0.089 and the mean number of allels(A) is 1.273. In short horse population, P=0.205, H=0.083, A=1.250. The above results indicated that both the common and short horse populations were wealthy of genetic diversity. There existed many variations of alleles in the two populations from limited areas of Yunnan Province. Futhermore, we calculated Nei's genetic distance (D) between the two populations and got a value of 0.0317, which imply a certain degree of genetic differentiation between them. According to the hypothesis of molecular clock, we speculated that the divergent event occurred about 18.5 million years ago.

Key words Horse, Protein electrophoresis, Mean heterozygosity, Genetic distance